

# 单细胞凝胶电泳技术检测碳离子束和X射线照射对 Lewis肺癌细胞的DNA损伤

李萍<sup>1</sup> 周利斌<sup>1</sup> 何晶<sup>1,2</sup> 金晓东<sup>1,2</sup> 李强<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

<sup>2</sup> (中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要** 比较研究了 89.63 MeV/u 的碳离子束和 6 MeV 的 X 射线照射 Lewis 肺癌细胞所致的细胞克隆存活和 DNA 损伤效应, 以探讨单细胞凝胶电泳检测细胞辐射敏感性及重离子束治疗肿瘤的优势。结果表明, 在 10% 细胞存活水平上碳离子束的相对生物学效应(Relative biological effectiveness, RBE)值达到 1.77。单细胞凝胶电泳检测损伤 DNA 尾部百分含量(Tail DNA, TD)和 Olive 尾矩(Olive tail moment, OTM)的剂量效应曲线表明, X 射线的剂量效应曲线为线性, 而碳离子束诱导出一个包含线性和指数项的双阶段效应曲线。碳离子束辐照剂量大于 8 Gy 后 TD 和 OTM 都存在饱和效应。在 2 Gy 的剂量点, 高传能线密度(LET)碳离子束比 X 射线产生更低的存活分数和更高的初始 OTM。本研究提示: 在 Lewis 肺癌细胞中, 碳离子束照射比 X 射线产生更为强烈的细胞致死和 DNA 损伤效应, 可使肿瘤治疗具有更高效率。

**关键词** DNA 损伤, 碳离子束, X 射线, 单细胞凝胶电泳

**中图分类号** R730, R734.2, Q691

重离子与传统低传能线密度(LET)的 X 射线和  $\gamma$  射线相比, 其剂量分布具有 Bragg 峰, 能使高吸收剂量区集中于肿瘤部位, 从而有效地保护周围的健康组织, 并且其具有相对生物效应高、修复效率低等特点, 在放疗上具有更好的临床应用价值。但是, 即使是同一组织病理来源的不同种类的细胞系仍具有不同的辐射敏感性<sup>[1]</sup>, 因此, 预测细胞辐射敏感性在放疗上具有重要的临床价值, 通过预测结果可以制定病人的放疗计划, 提高治愈率, 减少治疗的副作用。

肿瘤组织原位辐射敏感性主要取决于肿瘤细胞本身固有的辐射敏感性。因此急需开展个体预试验, 体外检测病人肿瘤细胞对重离子束的内在辐射敏感性。细胞克隆存活试验是目前较受重视的检测肿瘤细胞内在辐射敏感性的方法, 但该方法较烦琐费时。临床急需快速、准确的检测方法。单细胞凝胶电泳是一种观察和检测单个细胞 DNA 链断裂的灵敏、简单、快捷的实验方法, 能用以快速检测不同电离辐射产生的 DNA 损伤。

本文利用碱性单细胞凝胶电泳的方法比较了 Lewis 肺癌细胞在经碳离子束和 X 射线照射后的 DNA 损伤情况, 并结合细胞克隆存活实验检测该细胞的辐射敏感性, 试图将单细胞凝胶电泳开发成为预测细胞辐射敏感性的方法, 为在中国科学院近代物理研究所开展的重离子束治癌项目提供必要的实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及其培养

Lewis 肺癌细胞购自中国医学科学院肿瘤医院研究所, 培养基为含 10% 类标准胎牛血清(兰州民海生物)的 DMEM (GIBCO) 培养液, 置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养。根据预实验绘制的生长曲线, 选取传代 20 h 后处于对数生长期的细胞进行照射。

### 1.2 照射

1.2.1 X 射线照射 使用兰州军区总医院放射医学

中国科学院“百人计划”项目(O506120BR0)和国家高技术研究发展计划(863计划, 2006AA02Z499)资助

第一作者: 李萍, 女, 1980年1月出生, 2006年于兰州大学获硕士学位, 现为中国科学院近代物理研究所研究实习员, 主要从事重离子治癌的基础研究

通讯联系人: 李强, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2007-08-07, 修回 2007-09-29

科的医用电子直线加速器 (Varian Clinac 2100C) 进行, X 射线能量为 6 MeV, LET 值约为 0.2 keV/ $\mu\text{m}$ 。选取的剂量点分别为 0、0.5、1、2、3、4、8 和 12 Gy, 剂量率为 4 Gy/min。每个剂量点设有 3 个重复样品。

1.2.2 碳离子束照射 利用中国科学院近代物理研究所的兰州重离子研究装置提供的 100 MeV/u  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束, 离子束经真空隔离窗, 探测器及空气隙等, 到达细胞样品表面的能量为 89.63 MeV/u, 这时碳离子束的 LET 为 28.3 keV/ $\mu\text{m}$ 。照射剂量点与 X 射线照射一致, 剂量率为 4 Gy/min。

### 1.3 细胞存活分数测定

照射细胞经胰蛋白酶消化后进行细胞精确计数。选择合适的稀释倍数稀释后, 以约每培养皿 100 个可存活细胞的浓度种植于培养皿中, 放置于 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 37 $^\circ\text{C}$  培养 7 d。吉姆萨法进行染色, 统计细胞数大于 50 个的克隆数。

### 1.4 单细胞凝胶电泳

碱性单细胞凝胶电泳法参考 Singh 等<sup>[2]</sup>人的方法: (1)制样: 用 PBS 液配制的 0.5% 正常熔点琼脂糖, 溶解后, 加在事先准备好的载玻片上, 用细玻棒使胶均匀展开, 常温下固化 5 min, 即第 1 层胶。取含有  $5 \times 10^5$  个细胞新鲜制备的细胞悬液, 在 37 $^\circ\text{C}$  下按 1:3 的比例与用 PBS 液配制 0.75% 低熔点琼脂糖充分混匀后, 加入到第 1 层胶上, 立即加盖盖玻片, 4 $^\circ\text{C}$  固化至少 5 min, 即第 2 层胶。(2)裂解: 取下盖玻片, 将凝胶载玻片浸入新配制的裂解液中 (2.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 1% 月桂酰肌氨酸钠, 100 mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ , pH=10; 用前加终浓度为 1% 的 Triton X-100 和 10% DMSO), 4 $^\circ\text{C}$  裂解 1.5h。(3)解旋: 从裂解液中取出载玻片用蒸馏水洗净去多余的盐分, 移入水平电泳槽解旋 25 min (1mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ , 300 mmol/L NaOH, pH=13)。(4)电泳: 25 V 电压, 300 mA 电流, 低温避光, 电泳 25 min。(5)染色和观察: 0.4 mol/L Tris (pH=7.5) 漂洗 3 次, 每次 10 min, 然后滴加 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭。放置 4 $^\circ\text{C}$  避光保存, 保持湿润。24 h 内观察, 以防荧光猝灭。(6)观察与计数: 选择激发波长 515~560 nm, 光栅波长 590 nm 的 Olympus BX51 荧光显微镜在视野 400 倍下同步照相, 每剂量点 3 张片子, 每张片子分析 50 个细胞。(7)图像分析: 彗星图像用 Casp1.2.2 软件 (Institute of Theoretical Physics, University of Wroclaw, Wroclaw, Poland) 进行分析。本研究中的 DNA 损伤参数分别为彗星尾部的 DNA 百分含量 (Tail DNA, TD) 和 Olive 尾矩

(Olive tail moment, OTM)。

### 1.5 实验数据获取

使用 Origin 7.0 软件进行统计分析和数据拟合。细胞存活分数 (Survival fraction, SF) 用线性平方模型 (Linear-quadratic, LQ) 进行拟合:

$$SF = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (1)$$

式中,  $D$  为吸收剂量,  $\alpha$  和  $\beta$  分别为 LQ 模型的线性和平方项系数。

X 射线照射的剂量曲线用线性回归 (Linear regression) 模型进行拟合:

$$TD(OTM) = a + b \times D \quad (2)$$

式中,  $TD$ 、 $OTM$ 、 $D$  如前述,  $a$  为初始尾部损伤 DNA 百分含量,  $b$  为斜率。

重离子照射的剂量曲线用指数修正的线性 (Exponentially-modified linear) 方程进行拟合:

$$TD(OTM) = a \times e^{-b \times D} \quad (3)$$

式中,  $TD$ 、 $OTM$ 、 $D$  如前述,  $a$  和  $b$  分别为方程的线性和指数系数。

## 2 结果

图 1 显示 Lewis 肺癌细胞经 X 射线和碳离子束照射后的剂量存活曲线, 高 LET 的碳离子束剂量存活曲线几乎呈线性衰减, 而 X 射线照射的剂量存活曲线呈现出一个明显的肩区, 代表着亚致死损伤修复。 $D_{10}$  是衡量细胞辐射敏感性的重要指标, 它是指细胞存活分数为 10% 时所需的射线剂量,  $D_{10}$  越大, 辐射敏感性越低。X 射线和碳离子束照射对应的  $D_{10}$  值分别为 4.29 Gy 和 2.42 Gy。因此, 在 10% 的存活水平上碳离子束的 RBE 为 1.77。表明 Lewis 肺癌细胞对高 LET 碳离子束的辐射敏感性比 X 射线高。

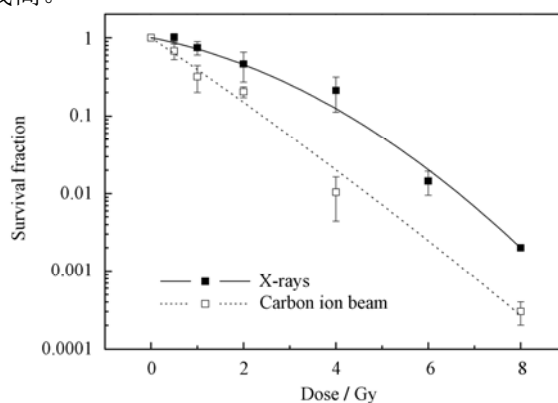


Fig. 1 Survival curves for Lewis lung carcinoma cell line after X-rays ( $LET=0.2$  keV/ $\mu\text{m}$ ) and carbon ion beam ( $LET=28.3$  keV/ $\mu\text{m}$ ) irradiation. Data points are presented as the mean  $\pm$  standard error (SE) coming from three replicates

图 2 (A) 和 2 (B) 是两个 DNA 损伤参数  $TD$  和  $OTM$  的剂量效应曲线。 $TD$  和  $OTM$  对 X 射线呈线性剂量效应, 并且  $TD$  和  $OTM$  曲线的斜率分别为  $2.21 \pm 0.19$  和  $1.14 \pm 0.08$ 。与 X 射线相比, 碳离子束诱导出一个双阶段的剂量效应曲线, 包含线性和指数项。其线性部分比 X 射线照射的剂量效应曲线斜率大。在高于 6 Gy 以后, 开始由线性过渡为指数效

应。在高于 8 Gy 的部分, 碳离子束的剂量效应在超过 90% 的置信水平上呈现出饱和效应 (见图 2)。与 X 射线照射相比, 碳离子束的  $TD$  和  $OTM$  值在 8Gy 时分别是 X 射线的 1.9 和 2.5 倍。同时, 以  $TD$  和  $OTM$  作为研究 DNA 损伤的指标, 其剂量效应曲线在本实验中并未显示出明显的差异。

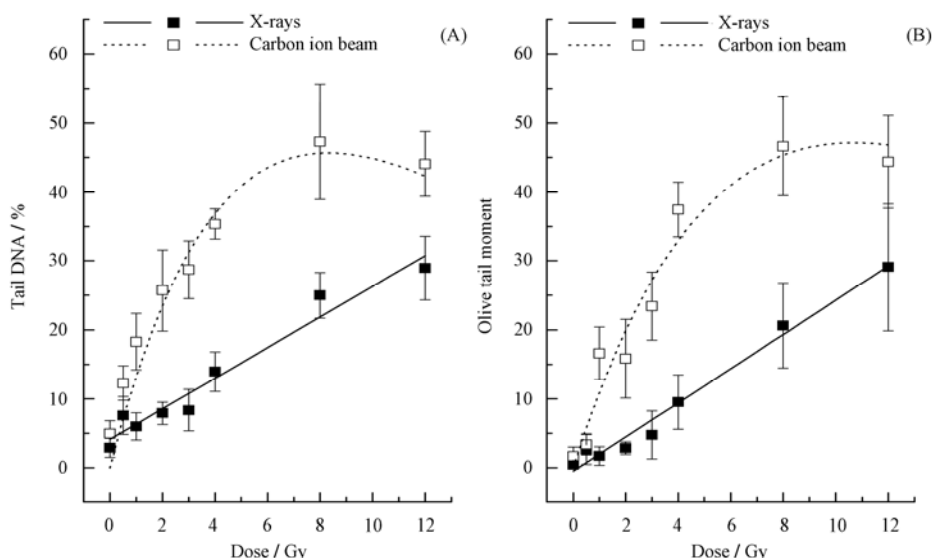


Fig. 2 Initial DNA damage in Lewis lung carcinoma cell determined immediately after X-rays and carbon ion beam irradiation. Best fits for the DNA damage parameters  $TD$  and  $OTM$  are demonstrated (A:  $TD$ ; B:  $OTM$ )

肿瘤细胞在 2 Gy 时的存活分数 (Survival fraction at 2 Gy, SF2) 是研究细胞内在辐射敏感性的指标, SF2 越低, 表明细胞辐射敏感性越高。本研究在 2 Gy 时的  $OTM$  值 (Olive tail moment at 2 Gy,  $OTM_2$ ) 作为研究初始 DNA 损伤的指标,  $OTM_2$  越高, DNA 损伤效应越明显。SF2 和  $OTM_2$  见表 1。高 LET 的碳离子束比 X 射线产生较低的 SF2 值和较高的  $OTM_2$ 。表明碳离子束对 Lewis 肺癌细胞产生更强的增殖性死亡和 DNA 损伤, 同时细胞克隆存活辐射敏感性与初始 DNA 损伤之间存在一定的相关性, 即 SF2 和  $OTM_2$  都能在一定程度上反映 Lewis 肺癌细胞对不同射线的敏感性。

Table 1 Parameters of the cellular radiosensitivity and initial DNA damage after the X-rays and carbon ion beam irradiation

Irradiation type	SF2	$OTM_2$
X-rays	$0.463 \pm 0.181$	$2.867 \pm 0.492$
Carbon ion beam	$0.174 \pm 0.032$	$15.833 \pm 3.826$
<i>t</i> -test	$P < 0.05$	$P < 0.01$

### 3 讨论

研究表明碳离子束与低 LET 的 X 射线和  $\gamma$  射线相比, 能产生更明显的细胞增殖性死亡<sup>[3]</sup>, 因此在放疗上具有更好的临床应用价值。本研究结果显示, 在 10% 的存活水平上, 碳离子束相对于 X 射线的 RBE 为 1.77, 表明碳离子束对 Lewis 肺癌细胞的致死效应显著高于 X 射线。

中性洗脱技术、脉冲场凝胶电泳技术证明无论是常规低 LET 辐射或是高 LET 辐射处理哺乳动物细胞, 其初始 DNA 损伤与剂量呈依赖关系。本研究通过碱性单细胞凝胶电泳再次印证了这一结论。在两种照射实验中, X 射线照射后的初始 DNA 损伤与剂量呈线性关系, 而对于 LET 较高的碳离子束, 呈现双阶段效应, 直线部分的斜率较大。有相关文献表明<sup>[4]</sup>, 对于同一种离子来说, LET 的变化对于剂量效应曲线的倾斜程度影响不大, 我们认为这里使曲线斜率增加的原因是射线种类发生变化。

越来越多的研究报道高 LET 辐射诱发的 DNA 损伤复杂性增加,因而由传统低 LET 辐射引入 DNA 损伤的随机分布模型不再适用。已有文献报道<sup>[5]</sup>,重离子辐射存在阈值效应。本文发现高于 6 Gy 的碳离子束照射 Lewis 细胞,其剂量效应曲线开始由线性过渡为指数效应;高于 8 Gy 的碳离子束辐照,其剂量效应呈现出饱和效应,即其 DNA 损伤达到了阈值。

近来的研究表明 SF2 和 DNA 损伤 OTM 具有反向关系<sup>[6]</sup>,但也有研究表明这种相关性并不存在<sup>[7]</sup>。我们的结果显示,高 LET 的重离子比 X 射线产生较低的 SF2 值和较高的初始 OTM2,反映出细胞克隆存活辐射敏感性与初始 DNA 损伤之间的反向关系。初始 DNA 损伤不仅与细胞辐射敏感性相关,还与射线的种类和性质有关<sup>[8]</sup>。X 射线与重离子能诱导不同种类的 DNA 损伤,细胞中的这些损伤更多的是成簇分布而非随机分布。这种成簇分布受到染色质结构的影响并且依赖于 LET。对于低 LET 射线,这种成簇分布主要发生在小量的 DNA 分子和核小体上;对于高 LET 的重离子,这种成簇分布发生在较大范围内并影响到染色质组成。LET 越高<sup>[9]</sup>,诱导出多位点 DNA 损伤和复杂损伤的几率就越大。因此 SF2 和初始 DNA 损伤之间的反向相关性在一定程度上反映了射线的种类和性质。

本研究结果显示,高 LET 碳离子束比低 LET 的 X 射线在 Lewis 肺癌细胞中产生更为高额的细胞增殖死亡和 DNA 损伤,提示射线的种类和 LET 可以影响 DNA 损伤的产额和分布,这些结果对于揭示高 LET 辐射的生物学效应机理有着重要的意义。

### 参考文献

- 1 Bergqvist M, Brattström D, Stalberg M, *et al.* *Cancer Lett*, 1998, **133**(1): 9-18
- 2 Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* *Exp Cell Res*, 1988, **175**(1): 184-191
- 3 Schwartz J L, *Mutat Res*. 2007, **616**(1-2): 196-200
- 4 Heilmann J, Taucher Scholz G, Kraft G. *Int J Radiat Biol*, 1995, **68**(2): 153-162
- 5 Cedervall B, Wong R, Albright N, *et al.* *Radiat Res*, 1995, **143**(1): 8-16
- 6 Costelloe T, FitzGerald J, Murphy N J, *et al.* *Exp Cell Res*, 2006, **312**(14): 2677-2686
- 7 Diskomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1998, **73**(3): 269-278
- 8 Malyapa R S, Wright W D, Roti Roti J L. *Radiat Res*, 1996, **145**(2): 239-242
- 9 Rydberg B. *Acta Oncol*, 2001, **40**(6): 682-685

## Detection of DNA damage of Lewis lung carcinoma cells irradiated by carbon ion beam and X-rays with comet assay

LI Ping<sup>1</sup> ZHOU Libin<sup>1</sup> HE Jing<sup>1,2</sup> JIN Xiaodong<sup>1,2</sup> LI Qiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

<sup>2</sup> (Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**ABSTRACT** In this study the effects of cell reproductive death and DNA damage of Lewis lung carcinoma cells exposed to 89.63 MeV/u carbon ion beam were compared with that exposed to 6 MeV X-rays irradiations in order to explore the feasibility and advantage of tumor therapy by use of heavy ions beam. Results showed that the relative biological effectiveness (RBE) value of the carbon ion beams at 10% survival level was estimated up to 1.77. There are linear effects in the dose response curves both of "Tail DNA (%)" (TD) and "Olive tail moment" (OTM) obtained with comet assay for the X-rays irradiation. However, the carbon ion beams revealed biphasic dose responses including linear and exponential terms. The dose responses for the carbon ion beams had a saturated effect beyond about 8Gy. There was an inverse correlation that the high linear energy transfer (LET) carbon ion beams produced a low survival fraction at 2Gy (SF2) and a high initial Olive tail moment at 2 Gy (OTM2) compared with X-rays irradiation. In conclusion, carbon ion beams with high LET values might produce more severe cell reproductive death and DNA damage in Lewis lung carcinoma cell in comparison with X-rays, which could make the tumor therapy more effective.

**KEYWORDS** DNA damage, Carbon ion beam, X-rays, Comet assay

**CLC** R730, R734.2, Q691